酿酒酵母木糖转运基因研究进展

黄俊[1,2*] 吴仁智[1,2] 陆琦[1,2] 芦志龙[1,2]

（1 广西科学院国家非粮生物质能源研究工程中心 南宁 530007）

（2 广西科学院生物质能源酶解技术国家重点实验室 南宁 530007）

摘要 由于对全球变暖等日益严重的环境问题的担忧，生产生物乙醇等清洁能源的技术正受到世界各国越来越多的关注。相比于以粮食作为原料生产乙醇，木质纤维素生产生物乙醇具有更大的发展潜力，因为它来源广泛，廉价且可再生。以木质纤维素生产生物乙醇已经取得长足进步，但仍面临几个主要问题，比如天然酿酒酵母不能利用木糖发酵乙醇，木质纤维素酶成本过高，木质纤维素预处理环节成本高等。已经有基因改造的酵母菌株可以利用戊糖和己糖进行生物乙醇生产。然而，这些菌株对木糖的利用效率很低。这主要是因为酿酒酵母缺乏高效的特异性木糖转运基因，木糖运输依赖已糖转运基因。为了提高木糖利用速度，已有不少方法成功应用于构建重组酵母细胞。现对酵母木糖转运基因的最新研究进展进行简要概述。

关键词 木糖 转运基因 酿酒酵母

[1]进入 21 世纪人类面临着能源与环境问题的巨大考验。随着经济的飞速发展，世界各国对能源的需求越来越大，然而化石能源的大量燃烧所排放的二氧化碳等温室气体在改变着整个地球的气候和环境。因此，世界各国开始将目光聚焦在以燃料乙醇为代表的清洁能源，现主要汽车大国都在大力推广以燃料乙醇替代汽油以期减少尾气排放[1]。目前，燃料乙醇的生产还处在第一代水平，即以玉米、甘蔗、木薯等粮食作物为原料发酵生产乙醇，其优点在于技术成熟，生产成本较低等。但第一代燃料乙醇的发展也带来粮食安全等严峻问题，这显然不适合在我们中国这个人口大国开展第一代燃料乙醇的生产[2]。

与第一代燃料乙醇不同，第二代燃料乙醇则是以木质纤维素如玉米秸秆、甘蔗蔗渣、小麦秸秆和柳枝稷等为原料生产燃料乙醇。相比于第一代燃料乙醇，第

*通讯作者，电子邮箱：jimh25@foxmail.com

二代燃料乙醇优势在于：1）生产原料不是粮食作物，不存在与人争粮问题，从而彻底解决粮食安全问题；2）秸秆、蔗渣等原料来源广泛，价格低廉，且具有可再生性等优点。木质纤维素主要是由纤维素、半纤维素、果胶和木质素组成，水解后可产生发酵乙醇所需的葡萄糖和木糖等糖类[1]。虽然某些细菌,如运动发酵单胞菌属(*Zymomonas mobilis*)和基因改造过的大肠杆菌(*Escherichia coli*),也能发酵葡萄糖等糖类生产乙醇,但酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）仍然是工业发酵生产乙醇的最佳选择[3]。这是因为酿酒酵母具有其他微生物所不具有的高乙醇发酵能力和乙醇耐受性。此外,在工业生产上酿酒酵母能够耐受低 pH 值,从而可以有效抑制噬菌体污染，避免因噬菌体污染造成的巨大浪费。然而酿酒酵母菌株自身缺乏利用木糖的代谢途径，使得约占水解糖 30%的木糖未得到充分利用而造成极大浪费。

尽管马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、树干毕赤酵母（*pichia stipitis*)、管囊酵母（*Pachysolen tannophilus*）和休哈塔假丝酵母（*Candida shehatae*）等酵母菌株可以发酵戊糖,但这些酵母并不适用于工业发酵乙醇[4]。因此,当前研究主要围绕将上述酵母的木糖代谢途径导入酿酒酵母菌株中表达。一种策略是将树干毕赤酵母木糖还原酶(xylose reductase，XR)和木糖醇脱氢酶(xylitol dehydrogenase，XDH)在酿酒酵母菌株中表达；另外一种策略是将木糖异构酶(xylose isomerase，XI)在酿酒酵母菌株中表达[5,6]。但是，重组菌的木糖利用速度和乙醇得率仍明显低于葡萄糖，可能的原因是木糖运输速度慢、蛋白质折叠或修饰不正确等[4]。现有研究结果表明，木糖的转运速度是木糖代谢过程的限速步骤[7]。因为酿酒酵母缺乏特异性木糖转运基因，木糖运输完全依赖已糖转运基因，受葡萄糖的强烈抑制。相比于已糖转运基因广泛而深入的研究，戊糖转运基因的转运机制及相应的调节机制的研究尚处于起步阶段。现对戊糖转运基因最新研究进展进行综述。

1. 协助木糖运输的已糖转运基因

将木糖从胞外运进胞内是木糖代谢的前提条件。现已知存在两种木糖转运系统：一种是在高糖浓度时表达，且不消耗能量的高通量低亲和性的主动扩散系统；另一种则相反，在消耗 ATP 的条件下将糖由低浓度向高浓度转运的高亲和性的木

糖／H+协运系统(图 1)[8]。高亲和性的木糖／H+协运系统只存在于树干毕赤酵母、产朊假丝酵母（*Candida utilis*）和休哈塔假丝酵母等少数酵母菌中。酿酒酵母运输葡萄糖和木糖都属于主动扩散系统（表 1)。

表 1：木糖和葡萄糖在酵母菌中转运方式[9]

Table 1: Xylose and glucose transport systems in yeast

酵母	木糖转运方式	葡萄糖转运方式
休哈塔假丝酵母（*Candida shehatae*）	主动扩散系统/质子协运系统，两者都存在	主动扩散系统/质子协运系统，两者都存在
产朊假丝酵母（*Candida utilis*）	质子协运系统	质子协运系统
马克斯克鲁维酵母（*Kluyveromyces marxianus*）	主动扩散系统	质子协运系统
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）	主动扩散系统	主动扩散系统
树干毕赤酵母（*pichia stipitis*）	质子协运系统	质子协运系统

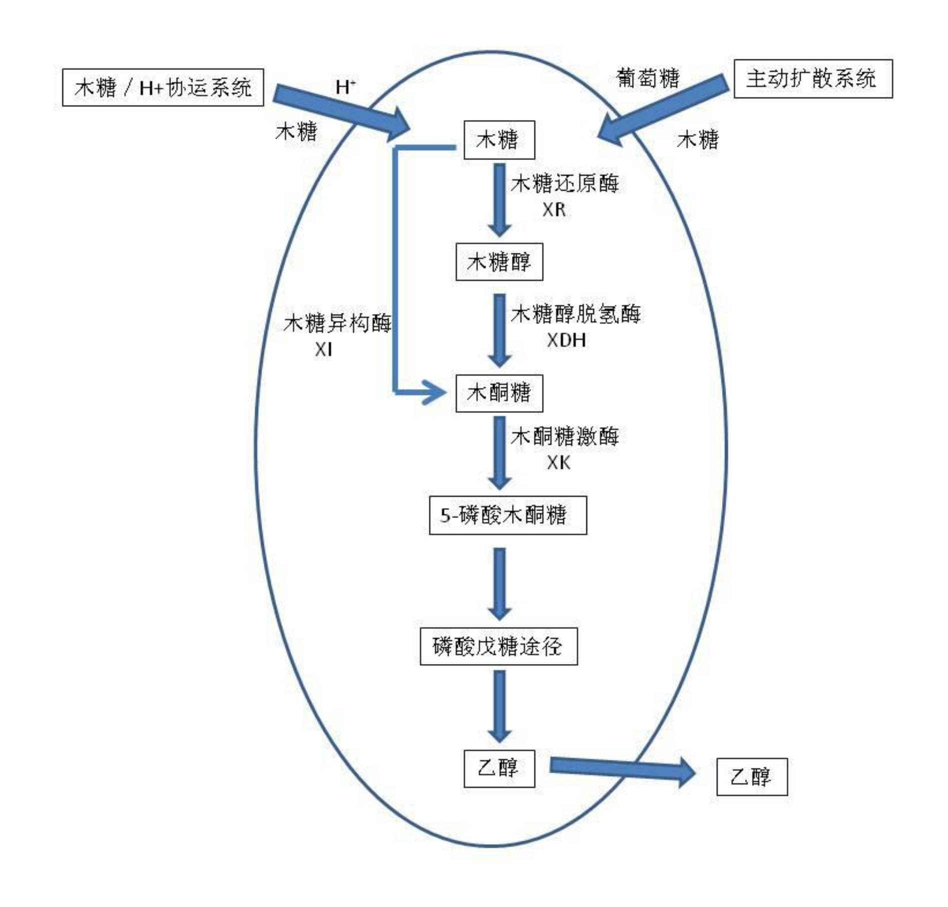


图 1 木糖在酵母体内运输与代谢[10]

Fig.1 Xylose transportation and fermentation in yeast

酿酒酵母自身有 18 个己糖转运基因(HXT1-17 和 GAL2)负责运送葡萄糖到胞内,其中 HXT1-7，这 7 个基因作为辅助因子还参与葡萄糖内化过程。根据其对葡萄糖的亲和力,这些已糖转运基因可分为三大类:高亲和性转运基因,HXT6、HXT7 和 GAL2(K_m 1～2mM);中等亲和性转运基因，HXT2、HXT4 和 HXT5(K_m ～10mM);低亲和性转运基因，HXT1 和 HXT3(K_m 50～100mM)[11-12]。其中 HXT5、HXT7、GAL2、HXT1 和 HXT4 具有运送木糖的能力,但受葡萄糖强烈抑制，木糖亲和力较葡萄糖低了近 200 倍且运送速度较慢[13, 14]。

低亲和性转运基因 HXT1 可以高效转运葡萄糖，其利用葡萄糖效率最高可以到达 100%，运送反应速率最高达到 2.5 g L^{-1} h^{-1}，乙醇生成速率为 0.96 g L^{-1} h^{-1}[14]。当木糖是唯一碳源时，HXT1 不能转运木糖，其木糖 K_m约为 880 mM。然而在木糖和葡萄糖共发酵时，HXT1 却能够转运木糖，木糖运送反应速率为 0.56 g L^{-1} h^{-1}，乙醇生成速率为 0.77 g L^{-1} h^{-1}，乙醇生产速度在几个木糖转运基因里是最高的[14]。HXT1 独特的特性表明其非常适用于木糖/葡萄糖混合发酵。HXT5 也有

HXT1 类似的特性，只有在木糖/葡萄糖混合发酵时会转运木糖，但 HXT5 转运葡萄糖速度很慢。在其他文献中有报道 HXT5 表达受葡萄糖强烈抑制，只有在木糖是唯一碳源或木糖葡萄糖共发酵时葡萄糖浓度降到低水平条件下才会转录表达[15]。HXT5 的作用可能是当葡萄糖匮乏时，可以转运其他糖类为细胞生长提供碳源[12]。

中等亲和性转运基因 HXT2 木糖 K_m 约为 130-390 mM。该转运基因转运葡萄糖和木糖的速度大致相同，葡萄糖转运反应速率为 0.63 g L^{-1} h^{-1}，木糖转运反应速率 0.58 g L^{-1} h^{-1}，利用葡萄糖和木糖产乙醇速率也是近乎相同，分别为 0.25 g L^{-1} h^{-1} 和 0.24 g L^{-1} h^{-1}[14]。HXT2 最大特点是在葡萄糖/木糖共发酵条件下糖转运不存在偏好性，但其受发酵产物的反馈抑制。和 HXT5 相同，HXT2 也受葡萄糖强烈抑制，高浓度葡萄糖甚至会引起 HXT2 内吞作用和降解，木糖也会引起 HXT2 失活，然而 HXT2 突变体则不存在失活现象。有研究表明，HXT2 基因只有在好氧条件下，且培养基中的葡萄糖由多转少之后才会呈现出高表达，据此推测 HXT2 基因表达需要同时满足低葡萄糖浓度和细胞处在指数生长期这两个特定条件[16]。此外，为适应所处生长环境的变化，在通过转录修饰后酿酒酵母会对 HXT2 亲和性进行调控以利于细胞生长[12]。

类似 HXT2，高亲和性转运基因 HXT7 能够以近乎同等速率转运葡萄糖和木糖，转运反应速率分别为 0.71g L^{-1} h^{-1} 和 0.70g L^{-1} h^{-1}，利用葡萄糖和木糖产乙醇速率也是近乎相同，分别为 0.33g L^{-1} h^{-1} 和 0.30g L^{-1} h^{-1}[14]。HXT7 转运木糖的速度和乙醇产量在这几个转运基因中都是最高的。通过分子进化改造，HXT7 木糖转运速率还能再提高[17]。在葡萄糖/木糖混合发酵时，HXT7 会存在偏好性，其优先转运葡萄糖。只有在木糖是唯一碳源或木糖葡萄糖共发酵时葡萄糖浓度降到低水平，HXT7 才会转运木糖[18]。与木糖作为唯一碳源相比，存在低浓度的葡萄糖(0.5 g/L)可以提高木糖利用率，这可能是由于低葡萄糖水平诱导 HXT7 表达[19]。高浓度的葡萄糖(> 200 mM)会严重抑制 HXT7 转录。

另一主要转运基因 GAL2 不但可以转运葡萄糖和半乳糖，还能转运木糖和阿拉伯糖。GAL2 转录由半乳糖诱导，葡萄糖会抑制表达,在不受抑制的情况下,GAL2 同 HXT7 一样是己糖转运基因中能使木糖转运速率达到最大值的转运基因[18]。

2. 异源木糖转运基因在重组菌中的表达

与酿酒酵母相比,自然界中存在许多能够利用戊糖的微生物，其拥有低亲和力和高亲和性木糖吸收运输系统,包括质子同向转运和易化扩散转运基因。通过深入研究基因组序列,现已发现有许多未知基因可以作为木糖特异性转运基因进行研究。目前已经有超过 80 多种异源转运蛋白在酿酒酵母菌中表达。

树干毕赤酵母是研究木糖代谢的模式菌株，其木糖转运基因和木糖代谢途径的研究也较为清楚。树干毕赤酵母菌中含有的 SUT1、SUT2、XUT1、XUT3(Xyp33)、XUT4、STL12(Xyp29)和 SUT3(Xyp37)等多个转运基因已经成功在酿酒酵母菌中表达[3]。除了 Xyp29 是木糖协助转运基因只转运木糖外，其他转运基因都能转运葡萄糖和木糖，XUT1 和 XUT3 还能转运果糖、半乳糖和甘露糖，然而这些转运基因的木糖亲和性仍然较低。这些低木糖亲和性的转运基因可以解释树干毕赤酵母在葡萄糖-木糖共发酵时出现的二次生长现象。据此推测，树干毕赤酵母可能存在调控机制，能够精确调节葡萄糖/木糖运输系统转换，而且木糖转运系统基因的数量和表达量要低于葡萄糖转运系统[20]。

间型假丝酵母(*Candida intermedia*)拥有高通量低亲和性的促进扩散系统和高亲和性的木糖一 H+协运系统，这也预示着存在木糖转运基因。有科研人员成功分离并鉴定了两个转运基因：GXF1(glucose xylose facilitator)和 GXS1(glucose xylose symporter)。GXF1,该转运蛋白是一个葡萄糖和木糖的扩散转运基因，其木糖 K_m 值为 0.4mmol/L；GXS1,是第一个从分子水平上表征的酵母高亲和性木糖 / 葡萄糖一 H^+ 协运基因[21]。相比于主动扩散系统，糖运输通过协运系统运输需要更多的能量,因此在厌氧条件下 ATP 产生受到限制时主动扩散会更有效[22]。

以间型假丝酵母高亲和性木糖 / 葡萄糖一 H^+ 协运基因 GXS1 的基因序列为模板，通过生物信息学分析同源序列，从粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)和树干毕赤酵母基因组中筛选到 18 个假定戊糖转运基因[23]。这 18 个转运基因和 GXS1 的同源相似度为 25-50%。通过基因功能鉴定，只有来自粗糙脉孢菌的 An25 基因和树干毕赤酵母的 Xyp29 基因最终被确定为木糖转运基因。An25 和 Xyp29 木糖 K_m 分别为 176 mM 和 56 mM。作为跨膜蛋白，这两个转运基因均能够在酿酒酵母内正确折叠并定位在细胞膜上，从而保证其功能的正常发挥。当转运木糖时，培养基的 PH 值并没有改变，这表明这两个转运基因是扩散转运基因。

与酿酒酵母相比，丝状真菌通过分泌纤维素酶从而降解木质纤维素成单糖，随后利用这些单糖生长。丝状真菌的基因组测序结果表明，其基因组含有大量糖转运基因同源序列[24]。然而，目前对丝状真菌的糖转运基因的研究才刚刚起步。Ana 等通过应用全基因组芯片技术对构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）在木糖培养基下表达呈现上调的转运基因进行筛选，从中筛选到五个糖转运基因，这些基因属于主要协助转运蛋白超家族（Major Facilitator Super family）[25]。基因测序结果分析表明这五个转运基因都属于 MFS family1，意味着这些转运基因是能够转运已糖和戊糖。随后的基因功能验证表明，在分别以木糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖为唯一碳源的培养基上，只有 xtrD 基因能够转运这些糖进入酵母胞内。在葡萄糖浓度固定而木糖浓度递增条件下，有 xtrD 基因的酿酒酵母生长明显受到抑制。通过对葡萄糖进行碳 14 标记，证明木糖会抑制酿酒酵母利用葡萄糖，从而导致细胞生长缓慢。另外，当构巢曲霉在低浓度木糖培养基生长时，xtrD 基因的表达明显增高。这些实验结果表明，在含有木糖培养时 xtrD 基因会优先转运木糖，这意味 xtrD 基因可能是高亲和性木糖转运基因。

Jasper 等通过改进 hidden Markov models（HMM）方法并结合转录组，根据进化树的远近关系筛选木糖转运基因[26]。他们分别从黑曲霉（*Aspergillus niger*）筛选到 XltA、XltB 和 XltC 三个转运基因，里氏木霉（*Trichoderma reesei*）筛选到 Str1、Str2 和 Str3 三个转运基因。这几个基因对木糖亲和性存在显著差异（表 2），XltA 亲和性最高(Km, 0.09 ± 0.03 mM), 其比黑曲霉另外一个已知木糖转运基因 MstA (Km, 0.3 ± 0.1 mM)还要高。XltC (Km, 4.71 ± 1.04 mM), Str1(Km, 5.70 ± 0.19 mM), Str2 (Km, 6.18 ± 0.81 mM)和 Str3(Km, 2.19 ± 0.29 mM)也显示出对木糖有高亲和性，只有 XltB(Km, 15.00 ± 4.50 mM)对木糖是低亲和性。转运葡萄糖时，除了 XltB 不转运葡萄糖外，其他 5 个基因都显示出对葡萄糖有高亲和性。特别是里氏木霉的三个转运基因和 XltC，其葡萄糖亲和性都显著高于木糖亲和性。只有 XltA 葡萄糖和木糖亲和性大致相同，而且 XltA 能够以相同速度转运葡萄糖和木糖。XltA 和 Str1 转录受木糖和 XlnR/Xyr1 调节因子的调控，这意味着这两个转运基因在木糖转运中起重要作用。

表 2 真菌转运基因动力学参数[26]

Table 2 kinetics parameters of fungal transporters

转运基因	木糖		葡萄糖	
	Km(mM)	Vmax(nmol/min/mgDW)	Km(mM)	Vmax(nmol/min/mgDW)
XltA	0.09±0.03	1.08±0.05	0.07±0.01	1.11±0.15
XltB	15.0±4.5	0.10±0.00	ND	ND
XltC	4.71±1.04	0.14±0.01	0.11±0.02	1.18±0.15
Str1	5.70±0.19	0.04±0.01	0.01±0.00	0.14±0.04
Str2	6.18±0.81	0.12±0.02	0.05±0.01	0.69±0.19
Str3	2.19±0.29	0.46±0.04	0.06±0.01	1.31±0.33

ND: not detectable

3.木糖转运基因定向进化

在以木糖为唯一碳源进行发酵时，HXT7 转运木糖的速率和转运葡萄糖速率不相上下。但在混合糖发酵时，HXT7 转运木糖速率受葡萄糖强烈抑制，因此对 HXT7 定向进化消除葡萄糖抑制显得尤为重要。Farwick 等对 HXT7 和 GAL2 的木糖亲和性基因位点进行探索[27]。他们发现对 HXT7(N370S)和 GAL2(N376F)位点突变后，这两个基因对木糖亲和性有很大提高，同时不再转运葡萄糖。说明转运基因序列中存在调控转运糖类的基因位点，这一发现为今后其他转运基因的定向改造打下良好基础。HXT11 转运木糖速率并不高，通过定向进化改造后其对木糖的亲和性有了很大的改善，该实验成果充分说明定向进化技术在改良转运基因方面有广阔的发展前景[28]。

相对于其他木糖转运基因， 类似 GXS1 这类转运基因对木糖具有更高的亲和力,但运输过程非常缓慢而且对葡萄糖亲和力始终高于木糖。科研人员通过对 GXS1 和其相似基因的序列研究，发现这些基因存在一个保守序列(G-G/F-XXXG)，通过对保守序列中的 $F^{38}I^{39}M^{40}$ 进行饱和突变以及理性改造后能够将 GXS1 木糖运输速率提高两倍[29]。另外，这一定向进化技术可以改造出不再运送葡萄糖的木糖转运基因。通过修改 HXT7 的 $I^{39}M^{40}M^{340}$ 和 Rgt2 的 $F^{38}M^{40}$ 成功将这两个转运基因改造成只运输木糖的转运基因[29]。

因为基因序列相似度很高，Jeroen 等将 HXT3 和 HXT6 的基因序列拼接在一起组成新的转运基因 HXT36[30]。HXT36 基因序列前段的 438 个氨基酸序列来自 HXT3，其后段 130 个氨基酸序列来自 HXT6。在 HXT36 的基因序列同样发现存在调控转运糖类的基因位点 HXT36-N367， N367 位点的突变子 HXT36-N367I 可以提高木糖亲和性，同时不再转运葡萄糖。相比于 HXT36-N367I，另一个突变子 HXT36-N367A

表现出更快的木糖转运速率和更高的木糖亲和性，而且其仍然能够转运葡萄糖，这使其更适合混合糖发酵。HXT36-N367A 表明在转运葡萄糖和木糖之间可以存在一个平衡点，在保证木糖高效转运情况下不排斥葡萄糖的转运。

除了定点突变的定向进化技术，易错 PCR（error-prone PCR）也是改造转运基因的好方法[31]。Wang 等将来源于粗糙脉孢菌的 An25 转运基因通过 4 轮定向进化后获得一重组基因 An25-R4.18[32]。相比于原始基因，重组基因的木糖转运速率提高了 43 倍，同时还保留了原有的木糖特异性。重组基因能有效提高酵母细胞在指数生长期阶段利用木糖的能力，而且在葡萄糖/木糖共培养方面也有一定的优势。

表 2：酵母木糖转运基因动力学参数

Table 2: Kinetic parameters of yeast xylose transporters

转运基因	木糖		葡萄糖		参考文献
	K_m(mM)	V_{max}(nmol/min/mg)	K_m(mM)	V_{max}(nmol/min/mg)	
HXT1	880±8	750±94	NR	NR	[33]
HXT4	170±120	190±23	NR	NR	[33]
HXT7	130±10	110±7	NR	NR	
HXT7	200.3±13.2	67±2	0.5±0.1	26±1.1	[27]
HXT7(N370S)	169.9±26.3	24.1±1.6	10.8±1.0	47.3±1.2	
GAL2	225.6±15.8	91.3±3.2	1.5±0.2	27.2±0.9	[27]
GAL2(N376F)	91.4±8.9	37.3±1.3	ND	ND	[28]
GXF1	48.6±6.5	64.19	2.0±0.6	10.5	[21]
GXS1	0.4±0.1	6.5±1.5	0.012	4.3±0.3	
GSX1	0.026±0.066	0.0072	NR	NR	[34]
GSX1 $F^{38}I^{39}M^{40}$	0.721±0.116	0.015	NR	NR	
SUT1	145±1.0	132±1.0	1.5±0.1	45.0±1.0	[34]
SUT4	16.6±0.3	122±2.4	1.3±0.1	105±4.2	[35]
XUT1	0.46±0.02	116±5.8	0.91±0.01	80±1.0	
XYP29	56±9.4	0.69±0.04	ND	ND	[36]
AN25	175.7±21.4	0.61±0.05	ND	ND	
HXT36	108	62.5	6	60	[25]
HXT36(N367I)	40	23	ND	ND	
HXT36(N367A)	25	29	171	71	

4.展望

世界各国为应对全球变暖等问题而大力发展可再生清洁能源，使用木质纤维素为原料生产燃料乙醇或其他化工产品是最有发展前景的可再生能源之一。纤维

素燃料乙醇的发展仍然面临许多问题，提高酿酒酵母利用木糖的能力是亟待解决的难题之一。酿酒酵母利用木糖有诸多需要解决的瓶颈，如木糖运输，提高木糖异构酶催化效率、木糖醇的形成等，其中木糖运输是木糖代谢的限速步骤。通过异源表达和定向进化改造特异性木糖转运基因可以有效解决木糖运输这一难题。

致谢：广西科技攻关（桂科重 14122004-1），广西科技合作与交流计划（1517-07），广西重点研发计划（桂科 AB16380024），广西科学院基本科研业务费资助项目（12YJ24SW04，13YJ22SW01）。

参考文献

[1] 黄俊，陈东，黄日波。纤维小体在燃料乙醇中的应用。中国生物工程杂志，2011，31（1）：103-108.
Huang J, Chen D, Huang R B. Research progress in cellulosome application in bio-ethnol. China Biotechnology, 2011，31（1）：103-108.
[2] 陈曦，韩志群，孔繁华，等。生物质能源的开发与利用。化学进展，2007,19(7/8):1091-1097.
Chen X，Han Z Q, Kong F H, et al. Exploitation and Utilization of Bio-Energy。Progress in Chemistry, 2007,19(7/8):1091-1097.
[3] Danuza N M,Viviane C B,Ricardo M A,et al. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. International Journal of Molecular Sciences,2016, 17(3), 207.
[4] 王娜，袁文杰，白凤武。酵母菌木糖转运蛋白研究进展。中国农业科技导报，2012，14(4)：24—30。
WANG N，YUAN W J，BAI F W, et al. Research Progress on Xylose Transporters in Yeast. Journal of Agricultural Science and Technology, 2012，14(4)：24—30.
[5] Almeida J R, Runquist D, Sànchez N V, et al. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Journal,2011,6(3):286 - 299.
[6] Peng B, Huang S, Liu T, et al. Bacterial xylose isomerases from the mammal gut Bacteroidetes cluster function in *Saccharomyces cerevisiae* for effective xylose fermentation. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1), 70.
[7] Alexander F, Stefan B, Virginia S, et al. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. PNAS,2014,111(14): 5159 - 5164.
[8] Sabire Z,Mark J. Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiology and Molecular Biology Reviews,1999,63(3):554 - 569.
[9] Sharma N K, Behera S, Arora R, et al. Potential Role of Xylose

Transporters in Industrial Yeast for Bioethanol Production: A Perspective Review. Proceedings of the First International Conference on Recent Advances in Bioenergy Research. Springer, New Delhi, 2016: 81-93.
[10] Matsushika A, Himyuki I, Kodaki T, et a1. Ethanol production from xylose in eugineered *Saccharomyces cereviziae* strains: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(1): 37—53.
[11] Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M, et al. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. European Journal of Biochemistry. 1997, 245(2):324 - 333.
[12] Diderich J A, Schepper M, Hoek P, et al. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 1999, 274(22): 15350 - 15359.
[13] Sedlak M, Ho N W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. Yeast, 2004, 21(8): 671 - 684.
[14] Davi L G, Akinori M, Belisa B S, et al. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 63:13 - 20.
[15] DeRisi J L, Iyer V R, Brown P O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science, 1997, 278(5338): 680-686.
[16] Özcan S, Johnston M. Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(3): 554-569.
[17] Apel A R, Ouellet M, Szmidt-Middleton H, et al. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in Saccharomyces cerevisiae. Scientific reports, 2016, 6.
[18] Hamacher T, Becker J, Gárdonyi M, et al. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. Microbiology, 2002, 148(9): 2783 - 2788.
[19] Lee W J, Kim M D, Ryu Y W, et al. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 60(1): 186 - 191.
[20] Eric Y, Ashley P, Austin C, et al. Functional Survey for Heterologous Sugar Transport Proteins, Using *Saccharomyces cerevisiae* as a Host. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 77(10):3311-3319.
[21] Leandro M J, Goncalves P, Spencer M. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast Ca,,zdida imermedia: first molecular characterization of a yeast xylose-H^+symporter. Biochemical Journal, 2006, 395(3): 543—549.

[22] Thomas W J. Engineering yeasts for xylose metabolism. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(3):320 - 326.
[23] Du J, Lia S J, Zhao H M. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. Molecular BioSystems, 2010, 6(11):2150-2156.
[24] Reis T F, Lima P B A, Parachin N S, et al. Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in Aspergillus nidulans. Biotechnology for biofuels, 2016, 9(1): 204.
[25] Ana C C, Laure N A, Neil A B, et al. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1):46.
[26] Jasper S, Juan A T, Dorett I O, et al. Identification and functional characterization of novel xylose transporters from the cell factories *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1):148.
[27] Farwick, A, Bruder S, Schadeweg V, et al. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. PNAS, 2014, 111(14):5159 - 5164.
[28] Shin H Y, Nijland J G, Waal P P, et al. An engineered cryptic Hxt11 sugar transporter facilitates glucose - xylose co-consumption in Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology for biofuels, 2015, 8(1): 176.
[29] Young E M, Tong A, Bui H, et al. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. PNAS, 2013, 111(1): 131 - 136.
[30] Jeroen G N, Hyun Y S, René M J, et al. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1):168.
[31]Young E M, Comer A D, Huang H, et al. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in Saccharomyces cerevisiae. Metabolic engineering, 2012, 14(4): 401-411.
[32]Wang M, Yu C, Zhao H. Directed evolution of xylose specific transporters to facilitate glucose - xylose co - utilization. Biotechnology and bioengineering, 2016, 113(3): 484-491.
[33] Saloheimo A, Rauta J, Stasyk O V, et al. Xylose transport studies with xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae strains expressing heterologous and homologous permeases. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(5):1041 - 1052.
[34] Weierstall T, Hollenberg C P, Boles E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. Molecular Microbiology, 1999, 31(3):871 - 883.
[35] Ferreira D, Nobre A, Silva M L, et al. XYLH encodes a xylose/H+ symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Research. 2013, 13(7):585 - 596.

[36] Du J, Li S, Zhao H. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. Molecular Biosystems, 2010, 6(11):2150－2156.

Research Progress on Xylose Transporters Of *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract Technologies for the production of biothanol are receiving increased attention around the world owing to concerns over the global warming. Lignocellulosic biomass is a great potential resource for the production of biofuels because it is largely abundant, inexpensive and renewable organic material. Significant efforts, many of which have been successful, have been made to convert these lignocellulosic biomass to valuable products, such as biofuels. Sustainable development in lignocellulosic bioethanol production has major challenge due to high cost of production. There are several issues such as efficient utilization of pentose sugars present in lignocelluloses, economical production of lignocellulolytic enzymes with high specificity, cost-effective pre-treatment of lignocellulosic biomass, etc. Genetically modified yeast strains have been approached to utilize pentose and hexose sugars for bioethanol production. However, these strains showed limited xylose consumption. *Saccharomyces cerevisiae* rely on the capacity of endogenous hexose transporters for xylose uptake, since *S. cerevisiae* lacks a xylose-specific transport system. Hence, there are several strategies that have been applied to engineer the yeasts which could improve the xylose transportation. This review has been focused to discuss the latest advancements in *S. cerevisiae* xylose transporter genes.

Key Words xylose transporter gene *Saccharomyces cerevisiae*